

03500.017889.



JFW

PATENT APPLICATION

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of:)	
	:	
YOSHIKATSU OKADA)	
	:	Group Art Unit: 1645
Application No.: 10/770,458)	
	:	
Filed: February 4, 2004)	
	:	
)	
For: PROBE MEDIUM AND METHOD	:	
OF PRODUCING THE SAME)	Date: June 11, 2004

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENT


Sir:

In support of Applicant's claim for priority under 35 U.S.C. § 119, enclosed is
a certified copy of the following foreign application:

Japan 2003-031670, filed February 7, 2003.

Applicant's undersigned attorney may be reached in our Costa Mesa, California office by telephone at (714) 540-8700. All correspondence should continue to be directed to our address given below.

Respectfully submitted,



Attorney for Applicant
Registration No. 54,334

FITZPATRICK, CELLA, HARPER & SCINTO
30 Rockefeller Plaza
New York, New York 10112-3800
Facsimile: (212) 218-2200

CA_MAIN 82159v1

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 2 月 7 日
Date of Application:

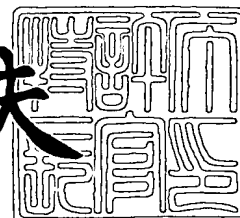
出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 0 3 1 6 7 0
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 0 3 1 6 7 0]

出 願 人 キヤノン株式会社
Applicant(s):

2 0 0 4 年 2 月 2 4 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 252281

【提出日】 平成15年 2月 7日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/10

【発明の名称】 プローブの基材上固定に効果的なプローブ媒体およびそのプローブ固定方法

【請求項の数】 1

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区下丸子 3 丁目 3 0 番 2 号 キヤノン株式会社
社内

【氏名】 岡田 良克

【特許出願人】

【識別番号】 000001007

【氏名又は名称】 キヤノン株式会社

【代理人】

【識別番号】 100088328

【弁理士】

【氏名又は名称】 金田 暢之

【電話番号】 03-3585-1882

【選任した代理人】

【識別番号】 100106297

【弁理士】

【氏名又は名称】 伊藤 克博

【選任した代理人】

【識別番号】 100106138

【弁理士】

【氏名又は名称】 石橋 政幸

**【手数料の表示】****【予納台帳番号】** 089681**【納付金額】** 21,000円**【提出物件の目録】****【物件名】** 明細書 1**【物件名】** 要約書 1**【プルーフの要否】** 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 プローブの基材上固定に効果的なプローブ媒体およびそのプローブ固定方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 基材へプローブを固定するために用いるプローブ媒体において、

有機溶媒を含む媒体と、標的物質に対して特異的に結合可能なプローブと、該プローブを該有機溶媒に可溶化させる物質と、を含むことを特徴とするプローブ媒体。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、標的物質に対して特異的に結合可能なプローブを含んでなるプローブ媒体に関する。また、本発明は、プローブを効果的に基材上に固定するために有用なプローブ媒体およびこのプローブ媒体を用いたプローブの固定方法に関する。さらには、プローブを基材上に固定することにより得られたプローブ固定基材を用いて標的物質を検出する検出方法に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

遺伝子工学、分子生物学などのバイオ分野の進歩により、感染症、癌や遺伝子疾患などについて DNA、RNA レベルでの診断が可能になってきた。DNA、RNA などの核酸による診断に用いられるツールの一つとして、DNA チップ、DNA アレイが注目されてきている。DNA チップ、DNA アレイを始めとする診断ツールでは、核酸などのプローブを基材上に固定しておき、プローブと標的物質をハイブリダイズさせることにより検出を行なう。この DNA、RNA、核酸などの標的物質に対して特異的に結合可能なプローブは水に容易に溶解する水溶性を示し、エチルアルコール、イソプロピルアルコール、イソアミルアルコール、ジプロピレングリコール、クロロホルムなどの有機溶媒にはほとんど溶解しないことが知られている。

【0003】

スポットティングなどの方法により予め用意されたプローブを用いてDNAチップ、DNAアレイなどのプローブを固定した基材を作成する場合、プローブを基材上に固定する際にはプローブを、水もしくは水とpH調整の為の物質を含んだ水溶液に溶解させたものをプローブ媒体として用い、これを基材上に接触させることによりプローブを基材上に固定していた。具体的には、プローブを固定する方法としてDNAを水に溶解させたプローブ水溶液を調製した後に、調製したプローブ媒体を表面処理したウェルプレート中に分注、滴下することによりプローブを基材上に固定する方法が記載されている（例えば、特許文献1参照。）。また、DNAを10mM Tris・HCl pH7.6、1mM EDTA溶液で溶解させて濃度調整を行ない、これに4倍容のH₂Oと5倍容の固定化バッファー（1.5M NaCl、0.3M Tris・HCl pH8.0、0.3M MgCl₂）を加えて混和することによりプローブ媒体を調製する方法が記載されている（例えば、特許文献2参照。）。さらには、一本鎖DNAをTE緩衝液（pH7.5、10mM Tris／Cl、1mM EDTA）で段階希釈することによりプローブ媒体を調製している（例えば、特許文献3参照。）。調製したプローブ媒体をニトロセルロース膜にドット、風乾、加熱することによりDNAを基材上に固定している。

【0004】**【特許文献1】**

特開平08-23975号公報

【特許文献2】

特開平05-192198号公報

【特許文献3】

特登録02794728

【0005】**【発明が解決しようとする課題】**

しかしながら、従来用いられていた標的物質に対して特異的に結合可能なプローブを含むプローブ媒体の中に、基材上へプローブを固定するためのものとして

、プローブを有機溶媒に溶解させたものは無く、また、プローブ媒体中にプローブを有機溶媒に溶解させる物質を含むものについても無かった。従来用いられていたプローブ媒体は、標的物質に対して特異的に結合可能なプローブを水もしくは、水とpH調整の為の物質、吸着を低減させる為の物質を含んだ水溶液にプローブを溶解させたものであった。さらには、プローブ媒体を基材上にスポッティングなどの方法により点着するのに好適であるようにグリコール系溶媒、アルコール系溶媒を添加することは知られていたが、DNA、RNAなどの核酸を始めとするプローブを有機溶媒中に溶解させたものは無かった。このため、基材上へのプローブ媒体の点着を好適に行なうために、水を含まない有機溶媒のみのプローブ媒体が適当であっても、プローブが溶解しないことから実施することは難しかった。

【0006】

また、核酸などのプローブを有機溶媒中に溶解させることは、試料中よりDNA、RNAなどの核酸を始めとするプローブを抽出する場合に用いることは知られていた。しかしながら、プローブを基材上に固定するのに用いるプローブ媒体として、プローブを有機溶媒中に溶解させたものは無かった。また、プローブ抽出においてDNA、RNAなどの核酸を始めとするプローブを核酸結合性担体に結合させるために界面活性剤を含む溶液中に懸濁された担体を用いて核酸を結合させ抽出することは知られていたが、界面活性剤を含む溶液中にプローブを溶解させプローブ媒体として用いることは無かった。

【0007】

【課題を解決するための手段】

上記の課題は下記の発明によって解決された。

【0008】

(1) 基材へプローブを固定するために用いるプローブ媒体において、有機溶媒を含む媒体と、標的物質に対して特異的に結合可能なプローブと、該プローブを該有機溶媒に可溶化させる物質と、を含むことを特徴とするプローブ媒体。

【0009】

プローブを有機溶媒に可溶化させる物質としてはカチオン界面活性剤を挙げることができる。更に、具体的には、プローブを有機溶媒に可溶化させる物質として、n-ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミド、n-ヘキサデシルトリメチルアンモニウムクロリド、塩化セチルピリジニウムのいずれかの物質、もしくはこれらの2種以上の混合物を用いることができる。このプローブ媒体によりプローブおよびプローブを有機溶媒に可溶化させる物質を1つの媒体に含むものを作成することができた。また、プローブを有機溶媒に溶解させたプローブ媒体についても作成することができた。

【0 0 1 0】

(2) 上記(1)におけるプローブがDNAプローブを含む核酸プローブであるプローブ媒体。

【0 0 1 1】

このプローブ媒体をスポッティング方法により基材上に付与することにより固定して基材に固定化された核酸プローブを得ることができる。

【0 0 1 2】

(3) 標的物質に対して特異的に結合可能なプローブと、このプローブを有機溶媒に可溶化させる物質と、を各々容器中に格納し、基材上に固定する際に混合して使用するプローブ固定用試薬セット。

【0 0 1 3】

このプローブ固定用試薬セットのプローブとプローブを有機溶媒に可溶化させる物質とを有機溶媒を含む媒体中に混合し、基材へのプローブ固定のためのプローブ媒体を調製することができる。

【0 0 1 4】

【発明の実施の形態】

本発明にかかるプローブの基材上固定に効果的なプローブ媒体は、有機溶媒を含む媒体と、基材に固定化するプローブと、プローブを有機溶媒に可溶化するための物質を含む。また、本発明にかかるプローブの基材への固定方法は、このプローブ媒体を基材に付着させる工程と有する。

【0 0 1 5】

プローブとしては、一本鎖核酸プローブ、一本鎖DNAプローブ、一本鎖RNAプローブ、一本鎖PNAプローブなどが含まれる。媒体中に含まれるプローブの量としては、プローブ媒体中でのプローブの安定性を考慮すると、プローブ媒体を、例えば2mer～500mer、特には2mer～80merのプローブが、 $0.05 \sim 500 \mu\text{mol/l}$ 、特には $0.5 \sim 50 \mu\text{mol/l}$ の濃度となるように調製する。

【0016】

これらのプローブは、基材への結合のための反応部位を有するものであっても良く、この反応部位としては、官能基、ビオチンなどが挙げられる。この反応部位は適当な長さのリンカーの一部として提供されたものでもよい。例えば官能基としては、アミノ(NH_2)基、カルボニル(COOH)基、メルカプト(SH)基、水酸(OH)基などの官能基が挙げられる。特にはプローブ官能基としては、プローブ官能基合成の容易性を考慮するとアミノ基が好ましく、プローブ官能基の反応性を考慮するとメルカプト基が好ましい。

【0017】

プローブを有機溶媒に可溶化させる物質としては、界面活性剤、ミセル触媒を形成する界面活性剤などを挙げることができる。界面活性剤としては、カチオン界面活性剤が特に好ましい。カチオン界面活性剤としては、セチルトリメチルアンモニウムブロミド、セチルトリメチルアンモニウムクロリドが挙げられる。プローブ媒体中に含まれる量としては、プローブの有機溶媒への溶解性、プローブとしての安定性を考慮すると、媒体中には例えば $0.2 \mu\text{mol/l}$ 以上、好ましくは $1 \mu\text{mol/l}$ 以上の濃度となるように、また、 $400000 \mu\text{mol/l}$ 以下、好ましくは $40000 \mu\text{mol/l}$ 以下の濃度となるように界面活性剤の量を調整する。

【0018】

プローブを有機溶媒に可溶化させる物質をプローブ媒体中に混合する方法としては、予め所定の濃度の水溶液を調整し、これを滴下混合しても良い。また、所定の量を秤量した後、プローブ媒体中に混合しても良いが、溶解しやすさ、混合のしやすさを考慮した場合、予め水に溶解し、水溶液として混合するのが好まし

い。

【0019】

プローブおよびプローブを有機溶媒に可溶化させる物質を含んでなるプローブ媒体としては、有機溶媒を含むものが用いられる。有機溶媒としては、エチレングリコール、チオジグリコール、ジエチレングリコール、プロピレングリコール、ジプロピレングリコール、グリセリン、メタノール、イソプロピルアルコール、アセチレンアルコール、エタノール、オルガノシランなどの有機溶媒が挙げられる。プローブ媒体に含まれる有機溶媒としては1種のものに限定されるものではなく、2種以上の溶媒の混合溶媒であっても構わない。また、有機溶媒としては3-イソシアネートプロピルトリエトキシシラン、 γ -グリシドキシプロピルトリメトキシシランなどのオルガノシランを始めとするプローブ固定物質であっても構わない。

【0020】

上記プローブ媒体中に含まれる上記有機溶媒の量は、プローブ媒体を基材に附着させる観点から粘性、蒸気圧等を鑑みて1重量%～90重量%であり、5重量%～70重量%が好ましい。

【0021】

プローブ媒体は、プローブを基材上に固定する物質を更に含むものであっても構わない。この物質は、基材上にプローブと結合しうる部位が無い場合や、プローブを基材上に固定するのに十分な結合を得るのが難しい場合に好適である。プローブを基材上に固定する物質としては、プライマー、カップリング剤、シーラント、表面処理剤、表面改質剤、架橋剤、二価性試薬などが含まれる。これの1種を、または必要に応じてこれらの2種以上を組み合わせ用いることができる。

【0022】

媒体中に含まれるプローブを基材上に固定する物質の量としては、プローブの基材上への固定性を考慮すると、プローブ媒体中には例えば0.05～5000 $\mu\text{mol}/\text{l}$ 、特には10～500 $\mu\text{mol}/\text{l}$ の濃度となるように調整することが好ましい。これらの物質はプローブもしくはプローブ官能基と結合する部

位として官能基もしくはアビジンを有するものであっても良い。官能基としてはエポキシ (CHOCH_2) 基、アミノ (NH_2) 基、メルカプト (SH) 基、マレイミド基、クロロプロピル ($\text{C}_3\text{H}_6\text{Cl}$) 基、イソシアネート (NCO) 基などが含まれる。特にプローブと結合しうる官能基としては、プローブ官能基との結合を考慮するとエポキシ基、マレイミド基、クロロプロピル基が好ましい。また、これらのプローブを基材上に固定する物質は、基材上へ固定するための官能基を有するものであっても良く、官能基としてはアルコキシシリル (SiOR) 基、シラノール (SiOH) 基、アルコキシ (OR) 基などが含まれる。特に基材上への固定容易性からアルコキシシリル基、シラノール基が好ましい。シラノール基はアルコキシシリル基の加水分解により形成されるものであっても良い。プローブとプローブを基材上に固定する物質は媒体中において反応することにより結合するものであっても良く、反応は官能基間での化学反応による共有結合であることが好ましい。

【0023】

また、プローブ媒体としては、水を含むものであっても構わない。さらには、プローブ媒体には必要に応じて水溶性高分子材料が混合されていても構わない。水溶性高分子材料としては、ポリビニルアルコール (PVA)、ポリビニルピロリドン (PVP)、パオゲン、カルボキシメチルセルロース (CMC)、ヒドロキシエチルセルロース (HEC)、デキストラン、プルランなどがあげられ、ポリビニルアルコール (PVA)、ポリビニルピロリドン (PVP) などの汎用的な高分子水溶性材料であることが好ましい。これの1種を、または必要に応じてこれらの2種以上を組み合わせる用いることができる。

【0024】

水溶性高分子材料の媒体への混合方法としては、予め水溶性高分子材料を完全に溶解させた所定の濃度の溶液を作製し、この作製された水溶性高分子溶液を所定濃度となるように秤量し、混合する方法が好適である。水溶性高分子材料溶液としては、具体的には、ポリビニルアルコール粉末を秤量し、純水中に0.5～5質量%の濃度となるように添加して、加温しながら溶解させて得られたものを挙げるができる。この水溶性高分子水溶液を、プローブ媒体における濃度が

0.01～1質量%となるようにプローブ媒体中に混合することが好ましい。

【0025】

プローブ媒体を混合する手順としては、いくつかの手順が挙げられる。

【0026】

プローブ媒体中にプローブを基材上に固定する物質を含む場合、第一の方法として以下の方法を用いることができる。まず、プローブを少量の水で溶解した後、プローブを溶解した容器中にプローブを有機溶媒に可溶化させる物質を水に溶解させた水溶液を滴下、混合する。これにより、プローブは水に不溶となる為、沈降する。次いで、プローブを基材上に固定する物質を、沈降したプローブの入った容器中に滴下、十分に混合する。プローブとプローブを基材上に固定する物質とが十分に結合するように、混合時間、混合温度を調整するのが好ましい。十分に混合した後に、有機溶媒を滴下、混合する。有機溶媒の混合は少量ずつ分けで行なっても良く、また、複数種の有機溶媒を混合する場合は、予め混合したものを滴下しても良く、1種ずつ滴下混合しても良く、特に制約されるものではない。更に必要に応じて水溶性高分子および水を混合しても良い。水溶性高分子および水の混合方法としては、水溶性高分子の水溶液を調整した上で所定の量となるように滴下、混合するのが好ましい。

【0027】

第二の方法としては、以下の方法を用いることができる。まず、プローブの入った容器中にプローブを有機溶媒に可溶化させる物質を水に溶解させた水溶液を滴下、混合する。これによりプローブは有機溶媒に溶解するようになり、水に不溶化する為、沈降する。次いでプローブを基材上に固定する物質の溶液を容器中に滴下、十分に混合する。プローブとプローブを基材上に固定する物質とが十分に結合するように、混合時間、混合温度を調整するのが好ましい。有機溶媒の混合、水溶性高分子の混合および、水の混合については、第一の方法と同様に行なうて構わない。

【0028】

第三の方法は、プローブとプローブを有機溶媒に可溶化させる物質とを混合処理しておくことによるものである。プローブを少量の水で溶解させた後、プロー

プローブを有機溶媒に可溶化させる物質を水に溶解させた水溶液を滴下、混合する。プローブが不溶化、沈降したことを確認した後にドライアップ、乾燥させて、余分な水分を除去する。容器中に残ったものがプローブとプローブを有機溶媒に可溶化させる物質とを混合処理したものである。これは、有機溶媒に可溶であるため、プローブを基材上に固定する物質を滴下、混合する。プローブとプローブを基材上に固定する物質が十分に結合するように、混合時間、混合温度を調整するのが好ましい。有機溶媒の混合、水溶性高分子の混合および、水の混合については、第一の方法と同様に行なって構わない。この方法に用いるプローブとプローブを有機溶媒に可溶化させる物質とを混合した物は、プローブ固定化用試薬として提供することができる。

【0 0 2 9】

プローブ媒体中にプローブを基材上に固定する物質を含まない場合、第一の方法としては以下の方法を用いることができる。まず、プローブを少量の水で溶解した後、プローブを溶解した容器中にプローブを有機溶媒に可溶化させる物質を水に溶解させた水溶液を滴下、混合する。これにより、プローブは水に不溶となる為、沈降する。次いで、有機溶媒を滴下、混合することによりプローブを溶解させる。有機溶媒の混合は少量ずつ分けて行なっても良く、また、複数種の有機溶媒を混合する場合は、予め混合したものを滴下しても、1種ずつ滴下混合しても良く、プローブの溶解が容易であれば特に制約されるものではない。更に必要に応じて水溶性高分子および水を混合しても良い。水溶性高分子および水の混合方法としては、水溶性高分子の水溶液を調整した上で所定の量となるように滴下、混合するのが好ましい。

【0 0 3 0】

第二の方法としては以下の方法を用いることができる。まず、プローブの入った容器中にプローブを有機溶媒に可溶化させる物質を水に溶解させた水溶液を滴下、混合する。これによりプローブは有機溶媒に溶解するようになり、水に不溶化する為、沈降する。次いで、有機溶媒を滴下、混合することによりプローブを溶解させる。有機溶媒の混合は第一の方法と同様に行なっても構わない。更に水溶性高分子の混合および、水の混合については、第一の方法と同様に行なって構

わない。

【0 0 3 1】

第三の方法は、プローブとプローブを有機溶媒に可溶化させる物質とを混合処理しておくことによるものである。プローブを少量の水で溶解させた後、プローブを有機溶媒に可溶化させる物質を水に溶解させた水溶液を滴下、混合する。プローブが不溶化、沈降したことを確認した後にドライアップ、乾燥させて、余分な水分を除去する。容器中に残ったものがプローブとプローブを有機溶媒に可溶化させる物質を混合処理したものである。これは、有機溶媒に可溶であるため、プローブを基材上に固定する物質を滴下、混合することによりプローブを溶解させる。有機溶媒の混合は第一の方法と同様に行なっても構わない。更に水溶性高分子の混合および、水の混合については、第一の方法と同様に行なっても構わない。

【0 0 3 2】

このようにして得られたプローブ媒体は、標的物質を検出するための固定化プローブの調製に用いるプローブ媒体として好適である。

【0 0 3 3】

得られたプローブ媒体を基材上にスポッティングすることによりプローブ固定基材を作製することができる。プローブを固定するための基材としては特に制約されるものではないが、標的物質の検出や材料としての汎用性を考慮するとガラス、石英基板材料もしくは、樹脂基板、プラスチック基板、樹脂フィルムが好ましい。具体的な材料としては、1 i n c h × 3 i n c h サイズのスライドガラス基板が好適である。プローブ固定の固定特性などを考慮すると、プローブ媒体中にプローブを基材上に固定する物質を含む場合には、ガラス材質中にアルカリ成分などが含まれない無アルカリ材料スライドガラス基板、石英ガラス材料、シリカコートガラス材料もしくは、シリカコート樹脂材料であることが好ましい。プローブ媒体中にプローブを基材上に固定する物質を含まない場合には、ガラスもしくは樹脂表面上に表面処理を施した材料が好ましい。表面処理としては、プローブが基材上に固定しやすくするものが好ましく、特に、カップリング剤などにより基材表面上にプローブと共有結合を形成する官能基を形成するものが好ま

しい。

【0 0 3 4】

また、標的物質の検出方法によっては基板状などの形状を制約されるものではないが、検出方法および装置などの汎用性から基板状態であることが好適である。さらには、表面の平滑性が高い基板材料であることが望まれる。

【0 0 3 5】

またプローブを固定するための基材としては、基材上に均一に尚且つ確実にプローブを固定するために、清浄面であることが好ましい。プローブを固定する前に予め基材上を洗浄することにより、十分な清浄面を確保しておくことが望まれる。基材上を清浄する方法としては、水による洗浄、薬液による洗浄、プラズマによる洗浄、UVオゾンによる洗浄、エアブローによる洗浄など多くの方法が知られている。これらの洗浄方法を用いて、基材の種類により洗浄方法、洗浄条件などを変更するのが好ましい。

【0 0 3 6】

例えば、プローブ媒体中にプローブを基材上に固定する物質を含む場合には、薬液を用いて基材表面を洗浄するのが適当である。例えば、所定濃度の水酸化ナトリウム水溶液を用いて基材表面を十分に洗浄し、基材上に付着した汚れを除去する方法が挙げられる。具体的に述べると、50℃程度に加温した1mol/l水酸化ナトリウム水溶液を用意し、水溶液中で基材表面をワイピングするもしくは水溶液をシャワーリングしながらブラッシングすることにより基材上に付着した汚れを確実に除去する。汚れを除去した後、余分な水酸化ナトリウム分を十分に水で洗い流す。最後にN₂ブローなどにより水分除去を行えば良い。このようにして、プローブ媒体を均一に尚且つ確実に固定しうる基材を得ることができる。

【0 0 3 7】

プローブ媒体中にプローブを基材上に固定する物質を含まない場合には、基材表面を水または溶媒により洗浄する、もしくはエアブローによる洗浄を行なうのが適当である。例えば、純水を用いて基材表面を十分に洗浄し、基材上に付着した異物を除去する方法があげられる。具体的に述べるのであれば、高圧純水シ

ャワー（２流体シャワー）を基板表面上に吹付けることにより異物除去する。異物除去後、再度、純水シャワーによりリンスを行ない、異物の混入した純水を洗い流す。最後にN₂ブローなどにより水分除去を行なえば良い。このようにして、プローブ媒体中のプローブを均一に尚且つ確実に固定しうる基材を得ることができる。

【0038】

プローブ媒体を基材上にスポッティングする方法としては、いくつかの方法が知られている。具体的な方法としては、ピン法、インクジェット法、ピン&リング法が知られている。これらの中でもインクジェット法は高密度で尚且つ正確なスポッティングができることから好適なスポッティング方法である。

【0039】

インクジェット法によるスポッティング方法において、プローブ媒体に含まれる成分は上記に示したようにプローブ媒体としてインクジェットヘッドから吐出させた時にプローブおよびプローブを有機溶媒に可溶化させる物質に対して実質的に影響を与えないものであって、且つインクジェットヘッドを用いて基材上に正常に吐出可能である媒体組成を満たすものであれば、特に限定されるものではない。例えば、インクジェットヘッドが媒体に熱エネルギーを付与して吐出させる機構を備えるバブルジェットヘッドである場合、グリセリン、チオジグリコール、イソプロピルアルコール、アセチレンアルコールを含む液体はプローブ媒体に含まれる成分として好ましいものである。更に具体的に述べるのであれば、グリセリン５～１０質量％、チオジグリコール５～１０質量％、アセチレンアルコール０．５～１質量％を含む液体がプローブ媒体として好適に用いられる。また、インクジェットヘッドが圧電素子を用いて媒体を吐出させるピエゾジェットヘッドである場合、エチレングリコール、イソプロピルアルコールを含む液体はプローブ媒体に含まれる成分として好ましいものである。更に具体的には、エチレングリコール５～１０質量％、イソプロピルアルコール０．５～２質量％を含む液体がプローブ媒体として好適に用いられる。

【0040】

このようにして得られたプローブ媒体をインクジェットヘッドより吐出させ基

材上に付着させた時、スポットの形状が円形で、また吐出された範囲が広がることがない。高密度にプローブ媒体をスポッティングした場合にも、隣接するスポットとの連結を有効に抑えることができる。なお、本発明のプローブ媒体の特性は上記のものに限定されるものではない。

【0 0 4 1】

基材上に付与されたプローブ媒体中に含まれるプローブを所定の位置に固定し、隣接するスポットに含まれるプローブとのコンタミネーションをより確実に防ぐために有効であり、かつプローブを基材上に強固に固定するための有効な手段として、プローブを基材上に固定する物質、基材のそれぞれが、もしくは、プローブ、基材のそれぞれがお互いに反応しうる官能基を有するものを用いる方法がある。

【0 0 4 2】

好ましい例としては、プローブ媒体中にプローブを基材上に固定する物質を含む場合、プローブを基材上に固定する物質側にシラノール（ SiOH ）基、基材上にも水酸（ OH ）基を有する組合せが挙げられる。この組合せによりスポッティングにより基材上に付与されたプローブ媒体中に含まれる物質のシラノール基と基材上の水酸基とが反応して基材上に物質が固定化される。具体的な基材をあげると、プローブを基材上に固定する物質にシランカップリング剤がシラノール基を有するものであり、基材に先に述べたガラス材料、石英基板材料、樹脂基板表面にシリカコートした材料が水酸基を有するものであり好適である。

【0 0 4 3】

プローブ媒体中にプローブを基材上に固定する物質を含まない場合の好ましい例としては、プローブにアミノ（ NH_2 ）基、基材側にエポキシ基を有する組合せが挙げられる。この組合せによりスポッティングにより基材上に付与されたプローブ媒体中に含まれるプローブのアミノ基と基材上のエポキシ基とが反応して基材上にプローブが固定化される。具体的な基材をあげるのであれば、プローブにアミノ基を付加したDNA、基材に先に述べた表面処理を施しエポキシ基を導入した樹脂基板材料が基材上にエポキシ基を有するものであり好適である。

【0 0 4 4】

さらに、プローブ媒体中にプローブを基材上に固定する物質を含む場合、プローブとプローブを基材上に固定する物質との間については、プローブと該物質との間において、反応することにより結合していることが好ましい。反応することによりプローブと該物質は強固に結合する。この結果、プローブは基材上により強固に固定化され、プローブのスポットを所定の位置に形成することができる。特に官能基としてアミノ基を有するプローブおよび、プローブと反応しうる官能基にイソシアネート基、基材上官能基と反応しうる官能基にシラノール基を有する物質を含んでなるプローブ媒体を調製し、所定の比率となるようグリセリン、チオジグリコール、イソプロピルアルコール、アセチレンアルコールなどを混合したプローブ溶液を調製する。このプローブ溶液を官能基として水酸基を有する基材上にインクジェットヘッドを用いてスポッティングを行なった場合、プローブ溶液は基材上に安定した大きさのスポットを形成する。このようにして、プローブを基材上の所定の位置に固定することができる。

【 0 0 4 5 】

なお、プローブとプローブを基材上に固定する物質との間が反応することにより結合する場合には、プローブ媒体中には水溶性高分子材料であるポリビニルアルコール（P V A）を混合させておくことが好ましい。より好ましくは、完全に溶解させておくことが望まれる。プローブ媒体中へ水溶性高分子材料を混合することにより、基材上におけるスポッティング状態の観察を容易にし、スポッティング後のスポットにおけるプローブ媒体を乾燥しにくくすることにより、より確実にプローブ媒体と基材上を反応させ固定できるようになる。さらには、スポッティングにより作製されたプローブ固定基材の保管状態を考慮すると、スポッティングにより形成されたプローブ媒体スポットが乾燥した場合においても標的物質を効率よく、尚且つ安定に検出するのに有効である。

【 0 0 4 6 】

プローブ媒体を基材上にスポッティングした基材を乾燥させることが好ましい。乾燥させることによりプローブ媒体中のプローブが基材上に確実に固定される。乾燥させる方法としては真空乾燥、加熱乾燥などさまざまな方法が考えられるが、簡易的に確実に実施できることから、加熱乾燥が適当である。加熱乾燥の方

法としてはホットプレートによる加熱乾燥が好ましい。具体的には加熱したホットプレート上にプローブ媒体をスポッティングした基材を静置する。所定時間静置した後、基材を取り外し自然に冷却させる。ホットプレートの温度は、プローブの耐熱性を考慮した場合、100℃以下が好ましく、更に詳しく述べるのであれば、60℃～90℃が好ましい。静置する時間としては30min以下が好ましく、更に詳しく述べるのであれば、1～10minが好ましい。

【0047】

例えば、塩基長20merのプローブを含むプローブ媒体をプローブ濃度が9 $\mu\text{mol/l}$ となるように調製した。プローブを有機溶媒に可溶化させる物質の添加量は、プローブ濃度に対して塩基長数分だけ倍した濃度以上になるように調整した。好ましくは、プローブ濃度と塩基長数を乗したものを更に2～10倍した濃度となるように調整した。プローブ媒体はインクジェットヘッドを用いて、固相とインクジェットヘッドのノズルの間隔を0.2～0.5mm程度に設定し、該ノズルから吐出させた場合（吐出量は約20ピコリットル）、固相上には直径約170～250 μm 程度のスポットを形成することができ、また液体をノズルより吐出する際の飛沫に由来するスポット（以降「サテライトスポット」と称する）はルーペを用いての目視観察では全く認められなかった。

【0048】

ここで、このプローブ固定基材を用いて、例えば標的物質の検出等を行なう場合の検出精度（スポット積算強度）の向上を図ることを目的として、該プローブを固相表面に固定した後、該基材上のプローブ非結合部分がサンプル中に含まれる標的物質等と結合しないようにブロッキングを行なっても良い。ブロッキングは例えば、該基材を室温の2%ウシ血清アルブミン水溶液中に、例えば2時間程度浸すことにより行なわれる。基材上のプローブ固定部位以外への標識物質の吸着を防ぐ効果から考慮すると、ウシ血清アルブミン水溶液が好適である。なお、このブロッキングの工程は必要に応じて行なえば良く、例えばサンプルの該プローブ固定基材への供給を各々のスポットに対して限定的に行ない、スポット以外の部位へのサンプルの付着が実質的にない場合には行なわなくても良い。スポット以外の部位へのサンプルの付着は基材となる材料によっても異なる。特に基材

がガラス、石英、シリカコート樹脂である場合においては、ブロッキング処理は行なわなくても良い。

【0049】

この様にして作製するプローブ固定基材はその用途に応じて、例えば同じプローブを含む複数のスポットを有するように構成しても良く、また異種のプローブを各々含む複数のスポットを有する様に構成してもよい。プローブの種類、数量、配置は必要に応じて適宜変更することが可能である。そしてこの様な方法によってプローブが高密度に配置されたプローブ固定基材は、その後標的物質の検出や、標的物質塩基配列の特定等に用いられる。例えばサンプル中に含まれている可能性のある、塩基配列が既知の標的物質である一本鎖核酸の検出に用いる場合には、該標的物質の一本鎖核酸の塩基配列に対して相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸をプローブとして用い、該プローブを含む複数のスポットが固相上に配置されているプローブ固定基材を用意し、該プローブ固定基材の各々のスポットに、サンプルを供給して該標的物質の一本鎖核酸とプローブとがハイブリダイズするような条件下に置いた後、各々のスポットにおけるハイブリッドの有無を蛍光検出等の既知の方法で検出する。それによって、サンプル中における標的物質の有無の検出を行なうことができる。

【0050】

また、サンプル中に含まれている標的物質の一本鎖核酸における塩基配列の特定に用いる場合には、該標的物質の一本鎖核酸における塩基配列の複数の候補を設定し、該塩基配列群に対して各々相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸をプローブとして該基材上にスポッティングする。次いで、各々のスポットにサンプルを供給して該標的物質の一本鎖核酸とプローブとがハイブリダイズするような条件下に置いた後、各々のスポットにおけるハイブリッドの有無を蛍光検出等の既知の方法で検出する。これにより、標的物質の一本鎖核酸に対して塩基配列の特定を行なうことができる。また本発明に係るプローブ固定基材の他の用途としては、例えばDNA結合蛋白質が認識する特異的な塩基配列のスクリーニングやDNAに結合する性質を有する化学物質のスクリーニングへの適用が考えられる。

【0051】

プローブ媒体は、有機溶媒を含む媒体と、プローブと、プローブを有機溶媒に可溶化させる物質と、必要に応じて添加されるプローブを基材上に固定する物質と、を含んでなるものとして提供されてもよいし、これらの成分を少なくとも 2 つの成分に分割して別の容器内にそれぞれ調製して、使用時に混合できる状態とした試薬キットとして提供されてもよい。

【0 0 5 2】

プローブを容器中に収納するにあたり、容器は他の不純物などが混入することの無いように密閉することが可能である容器であることが好ましく、また、固定する際に混合することが容易であるように開封できるものである必要がある。容器としての開封については特に限定されるものではない。容器中に収納するプローブの状態としては特に限定されるものではないが、溶液状であっても粉末状であっても構わない。官能基がメルカプト基などである場合、プローブの安定性を考慮した上でフリーズドライ法などにより粉末化したものとした上で、高温にならないように保管することが好ましい。官能基がアミノ基などの場合であっても保管状態としては、プローブの安定性を確保するために冷凍保存することが好ましいが、保管期間、プローブ種類、プローブ官能基などに応じて保管状態を変更することは可能である。このように、プローブを容器中に収納し、保管した状態で基材上に固定する際に混合するものであっても構わない。

【0 0 5 3】

このような用途に、プローブを有機溶媒に可溶化させる物質として界面活性剤を用いる場合には、界面活性剤は溶液であるものが好ましいが、粉末固体であっても溶媒に溶解させて使用することができるものであれば構わない。

【0 0 5 4】

プローブを基材上に固定する物質を容器中に収納するにあたり、容器は他の不純物などが混入することが無いように、さらには物質が揮発することにより減量することが無いように密閉することが可能である、もしくは密閉された容器であることが好ましく、また、固定する際に混合が簡易的であるように容易に開封できるものであることが好ましい。しかしながら、容器としての開封については特に限定されるものではない。容器中に収納する物質の状態は特に限定されるもの

ではなく、溶液状でも粉末状でも構わない。さらには基材上へ固定するための官能基例であるシラノール基を形成するために加水分解した溶液でも構わない。保管状態としては、物質の安定性を確保するために室温保存することが好ましいが、保管期間などに応じて保管状態を変更することは可能である。特に、加水分解した溶液である場合は保管中における温度が上昇しない方が好ましい。また、プローブを基材上に固定する物質の官能基に応じて、加水分解時、加水分解後の pH を調整することにより安定性を得ることが好ましい。

【0055】

プローブを基材上に固定する際に、これら容器に収納されたプローブおよびプローブを固定する物質を混合するにあたり、必要に応じて水などの溶液を添加しても構わない。また、プローブ媒体とするために十分混合するための物質、例えば水などの溶媒を別容器に収納しておき、プローブ媒体調整時に混合するものであっても構わない。

【0056】

【実施例】

以下実施例をもって本発明を更に詳細に説明する。

【0057】

〔実施例 1〕

(1) プローブの合成

標的物質に対して特異的に結合可能なプローブとして一本鎖 DNA プローブを用いた。DNA 自動合成機 (Applied Biosystems 社製、Model 380A) を用いて配列番号 1 の一本鎖 DNA プローブを合成した。なお、配列番号: 1 の一本鎖 DNA 末端には 5' 末端の水酸基にリン酸基とヘキサメチレンを介してアミノ基を結合した 18 量体のオリゴマーを用意し、以下の実験に用いた。

配列番号: 1

5' H₂N-(CH₂)₆-O-PO₂-O-ACTGGCCGTCGTTTTTACA 3'。

【0058】

(2) プローブ可溶化物質

プローブを有機溶媒に可溶化させる物質としてセチルトリメチルアンモニウムブロミド（*n*-ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミド）を用いた。セチルトリメチルアンモニウムブロミドが完全に溶解した水溶液とするために、50℃のウォーターバス中で加温しながら溶解させた。

【0059】

(3) プローブ固定物質

プローブを基材上に固定する物質としてのイソシアネート基を有するシラン化合物（3-イソシアネートプロピルトリエトキシシラン）を含むシランカップリング剤（商品名：KBE-9007；信越化学工業（株）社製）を以下の実験に用いた。

【0060】

(4) プローブ媒体の調整

上記(1)の配列番号：1の一本鎖DNAプローブを18nmolに分注、ドライアップしたものを用意し、これに20μlの純水を滴下、溶解させた。プローブを溶解させたプローブ水溶液にプローブを有機溶媒に可溶化させる物質セチルトリメチルアンモニウムブロミドの約65mmol/l水溶液を20μl滴下、混合した。これによりDNAプローブが水溶液中より析出し、プローブ媒体が白濁した。DNAプローブを遠心沈降した後に、上記プローブ固定物質を30μl滴下した。十分に攪拌、混合した後に、30分間静置した。

【0061】

ついで、有機溶媒であるジプロピレングリコール、イソプロピルアルコールをそれぞれ500μl、1000μl滴下し、5分間混合した。

【0062】

さらに水溶性高分子材料であるポリビニルアルコール（PVA）を濃度0.5質量%となるように純水中に溶解させた。完全に溶解させるためにホットバス中で80℃に加温しながら60分間攪拌した。不溶解物が無いことを確認した後、スポッティングにおいてノズルつまりが発生しないように濾過を行ない、PVA水溶液を調整した。

【0 0 6 3】

上記のとおり調整したプローブ溶液中に、上記のとおり調製したPVA水溶液を50 μ l 滴下した。最後に、プローブ媒体全量で2 ml となるように純水を滴下し、5 分間混合した。混合した後、3 0 分間放置し、プローブ媒体を調製した。

【0 0 6 4】

(5) 基板洗浄

1 i n c h \times 3 i n c h のシリカコートソーダライムガラス基板（厚み：約1 . 1 mm）を純水ですすぎ、表面に付着した異物を除去した。これをUV/O₃ 洗浄装置を用いて5 分間処理し、表面に付着した有機物を除去した。UV/O₃ 洗浄した基板をカセットに入れ、無機アルカリ系洗剤（商品名：セミクリーンKG；横浜油脂工業（株）社）の5 v o l % 水溶液に浸漬しながら、超音波を5 分間照射した。引き続き純水流水中でカセットごと基板を十分にすすぎ、ガラス基板およびカセットに付着した洗剤を水洗、除去した。十分にすすいだ後、純水中にカセットごとガラス基板を浸し、超音波洗浄を5 分間行なった。超音波洗浄後、純水流水中で十分にすすぎ、ガラス基板およびカセットに付着したパーティクルを水洗、除去した。水洗後のガラス基板をカセットごとスピンドライ乾燥させた。基板の洗浄を確認するために、基板上における純水接触角を測定した。その結果、基板のすべての部位においてスプレッド状態であった。

【0 0 6 5】

(6) プローブ媒体のスポッティング

上記（4）で調製したプローブ媒体をインクジェット装置を用いて基材上にスポッティングを行なった。インクジェットヘッドにはピエゾヘッドを用いた。ピエゾジェットヘッドにプローブ媒体を充填し、上記（5）で用意したガラス基板上に、プローブ媒体をスポッティングした。ここでピエゾジェットヘッドの液体吐出面とガラス基板の液体付着面との距離は約0 . 5 mmであった。スポッティング終了後、ガラス基板を顕微鏡により観察したところ、ガラス基板表面にマトリックス状のスポット配列が形成されていることが確認された。スポッティング終了後のガラス基板を8 0 $^{\circ}$ C に加温したホットプレート上に5 分間静置した。ホ

ットプレートでの処理をした基板はデシケーター内に保管した。このようにしてプローブ固定基材（プローブアレイ）を作製した。

【0066】

（7）ハイブリダイゼーション処理

上記（1）の配列番号1の一本鎖DNAプローブと相補的な塩基配列を有する一本鎖DNAプローブをDNA自動合成機で合成し、5'末端にローダミンを結合させて標識化した一本鎖DNAプローブを得た。この標識化一本鎖DNAを1M NaCl／50mMリン酸緩衝液（pH7.0）に最終濃度50nMとなるように溶解し、この溶液中に上記（6）で得たプローブ固定基材を浸漬し、室温（45℃）で2時間ハイブリダイゼーション処理を行なった。その後、プローブアレイを1M NaCl／50mMリン酸緩衝液（pH7.0）溶液で洗浄してプローブ核酸とハイブリダイズしなかった一本鎖DNAプローブを洗い流した。ついで、純水で余分な塩分を除去した後、窒素ブローによりプローブアレイを乾燥させた。次に該プローブアレイのスポットの蛍光を、蛍光スキャナ（商品名：GenePix 4000B；Axon Instruments, Inc. 製）を用いて蛍光強度を評価した。評価するにあたり、レーザーパワーを100%に設定し、PMTを400Vに設定した。

【0067】

（8）結果

上記（7）での蛍光スキャナ評価結果を解析したところ、標識化一本鎖DNAプローブと完全マッチである配列番号：1のDNAプローブのスポットでは、532nmでの蛍光強度が高い部位での輝度は5531であった。スポットの532nmでの蛍光強度積算値は6593912であった。また、DNAプローブのスポット部以外の蛍光強度を観察したところ40前後であった。各DNAプローブのスポットを蛍光で観察した状態では、各々のスポット形状がほぼ円形であり、同じプローブ媒体をスポットティングしたスポット間においては蛍光強度の差異は殆ど認められなかった。また、隣接するスポットとの間隔はほぼ均等であり、約300μmの間隔で格子状にスポットが配置されていることが観察された。

【0068】

〔実施例 2〕

(1) プローブの合成

実施例 1 と全く同様にして一本鎖 DNA プローブを用意した後、以下の実験に用いた。

【0069】

(2) プローブ可溶化物質

プローブを有機溶媒に可溶化させる物質としてセチルトリメチルアンモニウムクロリド (n-ヘキサデシルトリメチルアンモニウムクロリド) を用いた。セチルトリメチルアンモニウムクロリドが完全に溶解した水溶液とするために、50℃のウォーターバス中で加温しながら溶解させた。

【0070】

(3) プローブ固定物質

実施例 1 と全く同様にしてプローブ固定物質であるイソシアネートシランカップリング剤を用意した後、以下の実験に用いた。

【0071】

(4) プローブ媒体の調整

配列番号：1 の一本鎖 DNA プローブを 18 nmol に分注、ドライアップしたものを用意し、これに 20 μ l の純水を滴下、溶解させた。プローブを溶解させたプローブ水溶液にプローブを有機溶媒に可溶化させる物質セチルトリメチルアンモニウムクロリドの約 163 mmol/l 水溶液を 20 μ l 滴下、混合した。これにより DNA プローブが水溶液中より析出し、プローブ媒体が白濁した。DNA プローブを遠心沈降した後に、上記プローブ固定物質を 30 μ l 滴下した。十分に攪拌、混合した後に、60 分間静置した。

【0072】

ついで、有機溶媒であるジプロピレングリコール、イソプロピルアルコールをそれぞれ 500 μ l、1000 μ l 滴下し、5 分間混合した。

【0073】

さらに実施例 1 と全く同様にして PVA 溶液を調整した。上記のとおり調製したプローブ溶液中に、上記のとおり調製した PVA 水溶液を 50 μ l 滴下した。

最後に、プローブ媒体全量で 2 ml となるように純水を滴下し、5 分間混合した。混合した後、30 分間放置し、プローブ媒体を調製した。

【0074】

(5) 基板洗浄

実施例 1 と全く同様にして基板洗浄を行ない、ガラス基板を用意した。

【0075】

(6) プローブ媒体のスポッティング

上記 (4) で調製したプローブ媒体を用いて実施例 1 と全く同様にしてスポッティングを行ない、プローブ固定基材を作製した。スポッティング終了後、ガラス基板を顕微鏡により観察したところ、ガラス基板表面にマトリックス状のスポット配列が形成されていることが確認された。スポッティング終了後のガラス基板を 80℃ に加温したホットプレート上に 5 分間静置した。ホットプレートでの処理をした基板はデシケーター内に保管した。このようにしてプローブ固定基材 (プローブアレイ) を作製した。

【0076】

(7) ハイブリダイゼーション処理

実施例 1 と全く同様にしてハイブリダイゼーション処理を行なった。その後、プローブアレイを 1 M NaCl / 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 溶液で洗浄してプローブ核酸とハイブリダイズしなかった一本鎖 DNA プローブを洗い流した。ついで、純水で余分な塩分を除去した後、窒素ブローによりプローブアレイを乾燥させた。次に該プローブアレイのスポットの蛍光を、蛍光スキャナ (商品名: GenePix 4000B; Axon Instruments, Inc. 製) を用いて蛍光強度を評価した。評価するにあたり、レーザーパワーを 100% に設定し、PMT を 400 V に設定した。

【0077】

(8) 結果

上記 (7) での蛍光スキャナ評価結果を解析したところ、標識化一本鎖 DNA プローブと完全マッチである配列番号: 1 の DNA プローブのスポットでは、532 nm での蛍光強度が高い部位での輝度は 5836 であった。スポットの 53

2 nmでの蛍光強度積算値は6 3 7 7 2 1 1であった。また、DNAプローブのスポット部以外の蛍光強度を観察したところ5 0前後であった。各DNAプローブのスポットを蛍光で観察した状態では、各々のスポット形状がほぼ円形であり、同じプローブ媒体をスポッティングしたスポット間においては蛍光強度の差異は殆ど認められなかった。また、隣接するスポットとの間隔はほぼ均等であり、約3 0 0 μ mの間隔で格子状にスポットが配置されていることが観察された。

【0 0 7 8】

〔比較例1〕

(1) プローブの合成

実施例1と全く同様にして一本鎖DNAプローブを用意した後、以下の実験に用いた。

【0 0 7 9】

(2) プローブ可溶化物質

上記実施例1および2で用いた、プローブを有機溶媒に可溶化させる物質は、以下の実験に用いなかった。

【0 0 8 0】

(3) プローブ固定物質

実施例1と全く同様にしてプローブ固定物質であるイソシアネートシランカップリング剤を用意した後、以下の実験に用いた。

【0 0 8 1】

(4) プローブ媒体の調整

配列番号：1の一本鎖DNAプローブを1 8 n m o lに分注、ドライアップしたものを用意し、これに2 0 μ lの純水を滴下、溶解させた。プローブを溶解させたプローブ水溶液に、上記プローブ固定物質を3 0 μ l滴下した。十分に攪拌、混合した後に、6 0分間静置した。

【0 0 8 2】

ついで、有機溶媒であるジプロピレングリコール、イソプロピルアルコールをそれぞれ5 0 0 μ l、1 0 0 0 μ l滴下し、5分間混合した。

【0 0 8 3】

さらに実施例 1 と全く同様にして P V A 溶液を調製した。上記のとおり調製したプローブ溶液中に、上記のとおり調製した P V A 水溶液を $50\mu\text{l}$ 滴下した。最後に、プローブ媒体全量で 2ml となるように純水を滴下し、5 分間混合した。混合した後、30 分間放置し、プローブ媒体を調製した。

【0084】

(5) 基板洗浄

実施例 1 と全く同様にして基板洗浄を行ない、ガラス基板を用意した。

【0085】

(6) プローブ媒体のスポッティング

上記 (4) で調製したプローブ媒体を実施例 1 と全く同様にしてスポッティングを行ない、プローブ固定基材を作製した。スポッティング終了後、ガラス基板を顕微鏡により観察したところ、ガラス基板表面にマトリックス状のスポット配列が形成されていることが確認された。スポッティング終了後のガラス基板を 80°C に加温したホットプレート上に 5 分間静置した。ホットプレートでの処理をした基板はデシケーター内に保管した。このようにしてプローブ固定基材（プローブアレイ）を作製した。

【0086】

(7) ハイブリダイゼーション処理

実施例 1 と全く同様にしてハイブリダイゼーション処理を行なった。その後、プローブアレイを $1\text{M NaCl} / 50\text{mM}$ リン酸緩衝液 ($\text{pH } 7.0$) 溶液で洗浄してプローブ核酸とハイブリダイズしなかった一本鎖 DNA プローブを洗い流した。ついで、純水で余分な塩分を除去した後、窒素ブローによりプローブアレイを乾燥させた。次に該プローブアレイのスポットの蛍光を、蛍光スキャナ（商品名：GenePix 4000B；Axon Instruments, Inc. 製）を用いて蛍光強度を評価した。評価するにあたり、レーザーパワーを 100% に設定し、PMT を 400V に設定した。

【0087】

(8) 結果

上記 (7) での蛍光スキャナ評価結果を解析したところ、標識化一本鎖 DNA

プローブと完全マッチである配列番号1のDNAプローブのスポットでは、532 nmでの蛍光強度が高い部位での輝度は5744であった。スポットの532 nmでの蛍光強度積算値は419192であった。また、DNAプローブのスポット部以外の蛍光強度を観察したところ40前後であった。各DNAプローブのスポットを蛍光で観察した状態では、各々のスポット形状がほぼ円形であるが、各実施例に比べてスポットサイズが1/4程度に小さくなった。同じプローブ媒体をスポットティングしたスポット間においては蛍光強度の差異は殆ど認められなかった。また、隣接するスポットとの間隔はほぼ均等であり、約300 μ mの間隔で格子状にスポットが配置されていることが観察された。

【0088】

【発明の効果】

以上説明した様に、本発明によればプローブと、プローブを有機溶媒中に可溶化させる物質と及び有機溶媒を含む媒体とを含むプローブ媒体を用いることにより、プローブ媒体を基材上にスポットティングした時に、プローブを効率良く、安定的に基材上に固定させることができる。プローブ媒体はプローブおよびプローブを有機溶媒に可溶化させる物質を有し、プローブを有機溶媒中に溶解させるため、スポットティングを行なう際に好適な材料組成とすることが可能である。また、プローブ媒体中にプローブを基材上に固定する物質を含む場合、プローブとプローブを基材上に固定する物質とを効果的に結合させることができ、プローブを基材上に効率良く固定できるようになる。更には、プローブとプローブを基材上に固定する物質を結合させるために製造工程での制御、時間を簡略化、短縮することができる。引いては、材料の無駄を少なくでき、少ない工程で高品質なプローブ固定基材を製造できるようになる。

【0089】

また本発明によれば、多種のプローブを一つの基材上に固定する場合、各プローブ種に対応して結合物質種、濃度を選択することが可能となるばかりでなく、プローブ種に応じたプローブ固定物質を選択することも可能となる。さらにはプローブおよびプローブを基材上に固定する物質に応じてプローブ媒体組成が調整可能となる。このため、一つの基材上において多種プローブをプローブ種、プロ

ープ固定物質の組合せ毎に最適な条件で結合させることができる。

【 0 0 9 0 】

更に本発明によれば少量の検体からでも標的物質に関するより多くの情報を、より正確に検査可能なプローブアレイを得ることができ、またそれを用いることでサンプル中に標的物質が存在するか否かをより正確、且つ迅速に判定できる。同様にこのプローブアレイを用いることでサンプル中の標的物質の構造をより正確に、且つ迅速に特定することができる。

【 0 0 9 1 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> CANON INC.

<120> the mediators of probes for fixing them effectively on the base material and the method for probe fixing

<130> 252281

<140>

<141>

<160> 1

<170> Microsoft Word

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223> DNA probe

<400> 1

actggccgtc gttttaca

18

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 プローブ媒体を基材上にスポットティングしたときに、プローブを効率よく、安定的に基材上に固定させる。

【解決手段】 基材へプローブを固定するために用いるプローブ媒体において、有機溶媒を含む媒体と、標的物質に対して特異的に結合可能なプローブと、該プローブを該有機溶媒に可溶化させる物質と、を含むことを特徴とするプローブ媒体を提供する。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 0 3 1 6 7 0

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 0 0 1 0 0 7]

1. 変更年月日	1 9 9 0 年 8 月 3 0 日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都大田区下丸子 3 丁目 3 0 番 2 号
氏 名	キャノン株式会社